



The Probable Role of *GPR182* and *CALCRL* Genes in Endothelial Cells Dysfunction Caused by Hyperglycemia

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Rezaei Z.¹ MSc,

Abedi Kichi Z.¹ MSc,

Behmanesh M.*¹ PhD

How to cite this article

Rezaei Z, Abedi Kichi Z, Behmanesh M. The Probable Role of *GPR182* and *CALCRL* Genes in Endothelial Cells Dysfunction Caused by Hyperglycemia. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):249-256.

¹Genetics Department, Biological Science Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116.

Phone: +98 (21) 82884451

Fax: +98 (21) 82884717

behmanesh@modares.ac.ir

Article History

Received: January 21, 2020

Accepted: March 27, 2020

ePublished: June 10, 2020

ABSTRACT

Hyperglycemia is a major cause of diabetes. Hyperglycemia-induced endothelial dysfunction is generally believed to be the basis of diabetic vascular complications such as retinopathy, nephropathy, and cardiovascular diseases. The most important molecules in endothelial cells that can sense elevated level of glucose and transmit signals into the cell are G protein-coupled receptors (GPCRs).

In the present study, according to bioinformatics analysis of genomic sequences between healthy and patient individuals, two G proteins *GPR182* and *CALCRL* were selected and their expression levels were examined in hyperglycemic and normal conditions in HUVEC as a model of vascular endothelial cells at different glucose concentrations and various time intervals. In addition, the effects of hyperglycemia on cell viability and cell cytotoxicity were assessed by MTT and LDH assay, respectively, and also, morphological changes were evaluated by immunohistochemistry.

Overall, the results reveal a probable role for *GPR182* and *CALCRL* genes in hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. Thus, they could be developed as potential molecular targets for the endothelial dysfunction therapy.

Keywords Hyperglycemia; GPCRs; *GPR182*; *CALCRL*; Endothelial Dysfunction

CITATION LINKS

[1] Core competencies for diabetes educators ... [2] G protein-coupled receptors as new therapeutic targets ... [3] Hydrops fetalis, cardiovascular defects, and embryonic lethality in mice lacking the ... [4] Glucose and diabetes: Effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein ... [5] Clerodendrum volubile inhibits key enzymes linked to type 2 diabetes but induces cytotoxicity in human embryonic kidney ... [6] Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis ... [7] Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) ... [8] Endothelial mechanotransduction, nitric oxide ... [9] GPCR-mediated signaling of metabolites [10] ASGR1 but not FOXM1 expression decreases in the peripheral blood mononuclear ... [11] Oral diabetes medication and risk of dementia in ... [12] Activation of AMP-activated protein kinase alleviates high-glucose-induced dysfunction of brain microvascular ... [13] A practical note on the use ... [14] High glucose-induced hyperosmolarity impacts proliferation, cytoskeleton remodeling and migration of human induced ... [15] Soluble adhesion molecule E-selectin predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus [16] Metformin improves endothelial function in ... [17] Astragaloside IV protects against hyperglycemia-induced vascular endothelial dysfunction by ... [18] Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial ... [19] Cardiovascular effects of exogenous adrenomedullin and CGRP in Ramp and Calcrl deficient mice [20] The Ki-67 protein: From the known and the ... [21] Twenty-four-hour variations in blood glucose level in Japanese type 2 ... [22] G-protein-coupled receptors (GPCRs) in the treatment of diabetes: Current ... [23] Dopamine D4 receptor protected against hyperglycemia ... [24] Didymine prevents hyperglycemia-induced human umbilical ... [25] MicroRNAs in hyperglycemia induced endothelial ... [26] Thymosin beta 4 attenuates PrP (106-126)-induced human brain ... [27] Telmisartan mitigates hyperglycemia-induced vascular inflammation by increasing GSK3 β -Ser9 ...

نقش احتمالی ژن‌های *GPR182* و *CALCRL* در اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال رگ القاشده توسط هایپرگلیسمی

زینب رضائی MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

زهرا عابدی کیچی MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مهداد بهمنش* PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

وقوع هایپرگلیسمی عامل اصلی ایجاد بیماری دیابت است. به دنبال افزایش قند خون در بیماران مبتلا به دیابت عوارض عروقی در بافت‌های مختلف بدن روی می‌دهد که از جمله آن می‌توان به رتینوپاتی، نوروپاتی و افزایش شدید ریسک ابتلا به بیماری‌های قلبی اشاره کرد. عمده این تغییرات به واسطه تغییر در عملکرد سلول‌های اندوتلیال درون رگ رخ می‌دهد. از جمله مهم‌ترین مولکول‌هایی که افزایش قند خون را حس می‌کنند و سیگنال‌های مربوطه را به داخل سلول انتقال می‌دهند گیرنده‌های G- پروتئین (GPCR) هستند. در مطالعه حاضر پس از بررسی نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های ژنومیک بین افراد سالم و بیمار، دو G- پروتئین *GPR182* و *CALCRL* انتخاب شدند و تغییرات سطح بیانی آنها در شرایط هایپرگلیسمی با شرایط طبیعی در سلول‌های HUVEC به‌عنوان مدل سلول‌های اندوتلیال رگی در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بررسی شد. علاوه بر این، تاثیر هایپرگلیسمی روی زنده‌مانی سلول‌ها به کمک MTT، افزایش سمیت سلولی با سنجش فعالیت آنزیم LDH و تغییرات مورفولوژیکی سلول از طریق ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. نتایج حاصل حاکی از نقش احتمالی دو ژن *GPR182* و *CALCRL* در اختلال عملکرد اندوتلیال القاشده توسط هایپرگلیسمی است. بنابراین می‌توانند به‌عنوان اهداف مولکولی برای درمان اختلال اندوتلیال توسعه یابند.

کلیدواژه‌ها: هایپرگلیسمی، گیرنده‌های جفت‌شونده با G- پروتئین، *GPR182*، *CALCRL*، اختلال عملکرد اندوتلیال

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۰۸

*نویسنده مسئول: behmanesh@modares.ac.ir

مقدمه

از نظر فیزیولوژیکی، هایپرگلیسمی غالباً در اثر ناهنجاری‌های متابولیکی ایجاد می‌شود. افزایش قند خون باعث ایجاد تغییرات فنوتیپی و ژنتیکی در ساختمان سلول‌های سازنده عروق خونی می‌شود. اثرات هایپرگلیسمی اغلب غیرقابل برگشت است و منجر به اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال می‌شود^[1, 2]. قرارگرفتن در معرض هایپرگلیسمی به‌صورت مزمن به‌عنوان عامل اصلی در پاتوژنز عوارض جانبی دیابت مانند نوروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی، بیماری‌های قلبی- عروقی از جمله آترواسکلروز است که به واسطه اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال ایجاد می‌شود^[3, 4]. اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال ناشی از هایپرگلیسمی به واسطه اختلال در تولید اکسیدنیتریک، افزایش نفوذپذیری

اندوتلیال، افزایش بیان مولکول‌های چسبندگی و افزایش مرگ سلولی شناسایی می‌شود^[5]. سلول‌های اندوتلیال سلول‌های سنگفرشی ساده‌ای هستند که سطح لومن رگ‌های خونی را مفروش و به‌عنوان واسطه بین گردش خون و لایه داخلی رگ‌های خونی عمل می‌کنند. این سلول‌ها نسبت به تغییرات سطح قند خون حساس هستند^[6].

هایپرگلیسمی به‌عنوان یک عامل شتاب‌دهنده برای توسعه و ایجاد اختلال عروقی در دیابت شناخته می‌شود. با این حال مکانیزم‌های مولکولی آن به شکل دقیق شناخته شده نیست. بنابراین، تشخیص زودرس و درمان موثر هایپرگلیسمی در ایجاد تاخیر در بروز عوارض عروق میکرو و همچنین پیشگیری از عوارض عروق ماکرووی آن مفید خواهد بود^[7].

هومئوستاز گلوکز یک فرآیند متابولیک به‌شدت تنظیم‌شده و شامل چندین مکانیزم فیزیولوژیک است و چندین بافت و اندام در آن درگیر هستند. گیرنده‌های جفت‌شونده با G- پروتئین (GPCR) در بسیاری از روندهای سلولی به میزان زیاد دخیل هستند. GPCRها بزرگترین خانواده گیرنده‌های سطح سلول هستند و یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد آنها، بیان انتخابی بافتی- سلولی است و برخی از آنها به‌منظور کنترل ویژه غلظت گلوکز خون مورد استفاده قرار می‌گیرند^[8]. اخیراً محتوای GPCRs یک اندام، بافت یا سلول کامل (GPCRome) جزایر پانکراس و سایر بافت‌های مربوط به هومئوستاز گلوکز گزارش شده و ثابت شده است که تعدادی از GPCRها در عملکرد سلول‌های بتاپانکراس و مقاومت در برابر انسولین و یا چاقی دخالت دارند. بنابراین مطالعه عملکردی این دسته از پروتئین‌ها می‌تواند منجر به امکان توسعه درمان اختصاصی و هدفمند برای هایپرگلیسمی شود. مطالعات مربوط به توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) نشان داده است که GPCRها در بیماران مبتلا به دیابت در مقایسه با افراد سالم تفاوت‌های ژنتیکی نشان می‌دهند^[9, 10]. از این رو پس از انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی روی داده‌های NGS دو ژن *CALCR* و *GPR182* به‌عنوان کاندیدهایی که تفاوت‌هایی را در سطح ژنومیک بین افراد مبتلا به دیابت با افراد معمولی نشان می‌دهند، انتخاب شدند.

هر دو ژن *CALCR* و *GPR182* گیرنده آدرنومدولین (AM) هستند. آدرنومدولین یک پپتید چندمنظوره است که در گردش خون وجود دارد و به‌عنوان یک گشادکننده عروق شناخته شده است^[11]. سطح آدرنومدولین در جریان خون و در بسیاری از اشکال بیماری‌های قلبی- عروقی از جمله نارسایی قلبی افزایش می‌یابد و نقش محافظت‌کننده قلب و عروق را بازی می‌کند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تغییر بیان ژن‌های مذکور در شرایط هایپرگلیسمی در سلول‌های سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی (HUVEC) و تاثیر آن بر عملکرد این سلول‌ها به‌عنوان مدلی از سلول‌های جدار رگ‌های خونی است^[12].

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی (HUVEC) در فلاسک T25 با استفاده از محیط (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium؛ ایالات متحده) حاوی ۵ میلی‌مولار گلوکز و با افزودن L-گلوتامین ۲ میلی‌مولار، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱٪ پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با حضور ۵٪ دی‌اکسید کربن در ۳۷°C رشد داده و برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شدند.

بررسی زنده‌مانی سلول‌ها در حضور گلوکز

به‌منظور بررسی اثر هاپیروگلیسمی بر رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال رگ بند ناف از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش مبتنی بر شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات‌دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است [13].

به‌طور کلی تعداد 5×10^3 سلول در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سلول‌ها در تراکم ۷۰٪ با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۴۰ و ۷۰ میلی‌مولار گلوکز برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت زمان‌های ذکر شده به هر خانه ۲۰ میکرولیتر نمک MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در تاریکی در انکوباتور ۳۷°C و غلظت ۵٪ دی‌اکسید کربن قرار گرفت. سپس محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج و به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) برای حل‌شدن رسوب ارغوانی‌رنگ فورمازان اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل‌شدن رسوب فورمازان در DMSO، جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزاریدر (Biotek؛ ایالات متحده) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

جذب نورمال‌شده برای هر غلظت محاسبه و سپس برای بررسی معنی‌داری تفاوت بین مقدار جذب تیمارها با کنترل، تست آماری تحلیل واریانس دوطرفه (Dunnett test) انجام شد. آنالیز با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 7.04 انجام گرفت. آزمایش برای هر غلظت حداقل در سه تکرار انجام شد.

سنجش سمیت سلولی

سمیت سلولی با انتشار آنزیم سیتوپلاسمی لاکتات‌دهیدروژناز (LDH) به محیط کشت سلول پس از تیمار با گلوکز در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف با استفاده از کیت سنجش LDH به نام CyQUANT™ (Invitrogen™؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد. بدین منظور دو مجموعه رقیق‌سازی سریال سلول‌ها (صفر تا ۱۰۰۰ سلول/۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت) تهیه شد و با ۳ تکرار در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از انجام لیز سلولی، یک دسته از این سلول‌ها برای اندازه‌گیری حداکثر میزان لاکتات‌دهیدروژناز آزاد شد و مجموعه دیگر برای اندازه‌گیری میزان لاکتات‌دهیدروژنازی که به‌صورت ذاتی از سلول آزاد می‌شود استفاده شد. سپس سلول‌ها به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷°C انکوبه شدند.

به مجموعه سلول‌هایی که برای اندازه‌گیری میزان لاکتات‌دهیدروژناز ذاتی سلول بودند ۱۰ میکرولیتر آب استریل اضافه و به مجموعه سلول‌هایی که برای اندازه‌گیری میزان حداکثری LDH در نظر گرفته شدند، ۱۰ میکرولیتر بافر لیز ۱۰X اضافه شد و پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت.

پس از آن ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت هر نمونه (نمونه‌های کنترل برای فعالیت LDH ذاتی سلول و نمونه‌های کنترل برای فعالیت حداکثری LDH) به یک پلیت ۹۶ انتقال داده شد و در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الیزاریدر در طول ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. ارزیابی مقدار LDH براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 7.04 انجام گرفت.

استخراج RNA و سنتز DNA مکمل (cDNA)

به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های تحت تیمار با گلوکز، استخراج RNA از این سلول‌ها و سلول‌های کنترل انجام شد. برای استخراج از RiboEx (GeneAll؛ کره جنوبی) و دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از شست‌وشوی RNA کل استخراج‌شده در الکل سانتیفریوژ با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C انجام و رسوب در ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه تیمار شده با دی‌اتیل‌پیروکربنات (DEPC) حل شد.

نمونه RNA استخراج‌شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C نگهداری شد. کیفیت و کمیت این RNA به ترتیب توسط الکتروفورز روی ژل و دستگاه اسپکتروفتومتر (Thermo Fisher Scientific؛ ایالات متحده) مورد سنجش قرار گرفت. سپس سنتز DNA مکمل توسط کیت سنتز cDNA (Biofact؛ کره جنوبی) انجام شد. ساخت کتابخانه cDNA با استفاده از ۳ میکروگرم RNA کل و پرایمرهای الیگو dT و رندوم هگزامر (Metabion؛ آلمان) مطابق با دستورالعمل کیت شرکت سازنده انجام شد. واکنش با استفاده از ۲۰۰ واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد.

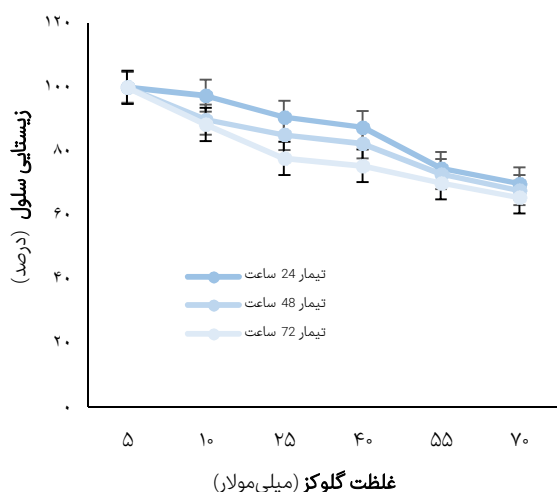
طراحی پرایمر

توالی ترانسکرپت ژن‌های *GPR182* و *CALCRL* از بانک ژن استخراج و پس از یافتن نواحی مشترک بین واریانت‌های مختلف (در مورد ژن *CALCRL*) طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 انجام شد. سپس با استفاده از NCBI BLAST از اختصاصی بودن محل اتصال پرایمرها اطمینان حاصل شد (جدول ۱).

انجام qRT-PCR

بعد از انجام الکتروفورز محصولات، بررسی بیان ژن‌های هدف به کمک تکنیک qPCR انجام شد. برای این منظور از مسترمیکس اواگرین (۵X)، پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های هدف و پرایمرهای ژن اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. ابتدا مخلوطی با مقادیر مشخص‌شده به ازای هر نمونه در هر

حالت کنترل کاهش معنی‌داری نداشت (نمودار ۱).



نمودار ۱) نتایج تیمار گلوکز بر سلول‌های HUVEC

بررسی اثر گلوکز بر سمیت سلولی

نتایج سنجش میزان لاکتات‌دهیدروژناز نشان داد که میزان سمیت سلولی در تیمار با گلوکز به‌صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش می‌یابد. به این صورت که با افزایش غلظت (از ۵ تا ۷۰ میلی‌مولار) و مدت زمان تیمار (از ۲۴ تا ۷۲ ساعت)، میزان سمیت سلولی (آزادسازی لاکتات‌دهیدروژناز) افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان سمیت مشاهده‌شده، ۲۵/۷٪ بود که در غلظت ۷۰ میلی‌مولار در تیمار ۷۲ ساعته مشاهده شد. همچنین غلظت ۲۵ میلی‌مولار گلوکز در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۳/۴، ۱۱/۳ و ۱۴/۹٪ میزان سمیت سلولی را افزایش داد (نمودار ۲). از این رو با توجه به نتایج حاصل و همخوانی آن با سایر مطالعات غلظت ۲۵ میلی‌مولار که معادل غلظت گلوکز در خون افراد دیابتی است برای سایر بررسی‌ها انتخاب شد.

بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز

به همین منظور RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. به این ترتیب باندهای ۱۸S و ۲۸S قابل تشخیص بودند که نشان دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج‌شده بود. همچنین عدم مشاهده باند اضافی بیانگر خلوص آن بود (شکل ۱).

بررسی بیان ژن *CALCRL* و *GPR182* در تیمار با گلوکز

با توجه به نتایج تست سمیت سلولی، در بررسی بیان ژن *CALCRL* در تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته با گلوکز با غلظت ۲۵ میلی‌مولار به ترتیب با $p = ۰/۰۰۳۲$ و $p = ۰/۰۴۵۹$ افزایش بیان معنی‌دار نسبت به حالت کنترل را نشان داد (نمودار ۳). این افزایش بیان در مورد ژن *GPR182* ($p = ۰/۰۰۶۳$) برای تیمار ۲۴ ساعته و $p = ۰/۰۰۱۴$ برای تیمار ۴۸ ساعته) نیز مشاهده شد که این تغییر در سطح بیان این دو ژن می‌تواند بیانگر پاسخ آنها به گلوکز باشد (نمودار ۴).

میکروتیوب تهیه شد. این مخلوط شامل ۲ میکرولیتر مسترمیکس اواگرین (۵X)، ۴/۰ پیکومولار پرایمر رفت (F)، ۰/۰ پیکومولار پرایمر برگشت (R)، ۲۰ نانوگرم cDNA و افزودن آب دیونیزه تا حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود. پس از آماده‌کردن، مخلوط‌ها به پلیت مخصوص Real-Time PCR منتقل شدند. سپس پلیت در دستگاه (Thermo Fisher) StepOne Applied BioSystem (ایالات متحده) قرار داده شد. آنالیز بیان ژن با استفاده از $2^{-\Delta CT}$ و مقدار بیان نسبی به کمک فرمول $2^{\Delta\Delta CT}$ انجام شد و برای آنالیز آماری از نرم‌افزار GraphPad Prism 7.04 استفاده شد.

ایمونوهیستوشیمی و رنگ‌آمیزی

به‌منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول HUVEC در اثر تیمار با گلوکز از تکنیک ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. برای ارزیابی تعداد 3×10^3 سلول با گلوکز ۲۵ میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سلول‌ها پس از تثبیت با پارافرمالدهید، با آنتی‌بادی اولیه ki67 (Abcam؛ انگلستان) به مدت یک شب انکوبه شدند و سپس آنتی‌بادی ثانویه Alexa fluor 635 (Abberior؛ آلمان) همراه با سیتوکس گرین (Invitrogen™؛ ایالات متحده) و رنگ‌کننده سلول فالوئیدین-آی فلئوئور ۴۰۵ (Abcam؛ انگلستان) به سلول‌ها اضافه شد. تصویربرداری به کمک میکروسکوپ لایکا DM6000B (Leica؛ آلمان) انجام شد. برای بررسی اثر تیمار گلوکز بر قطر هسته و مورفولوژی اسکلت سلولی از نرم‌افزار ImageJ 1.51 استفاده شد.

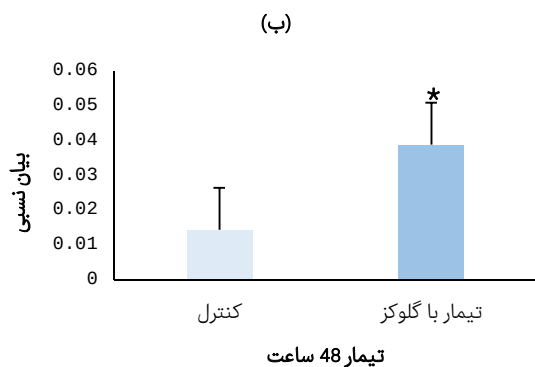
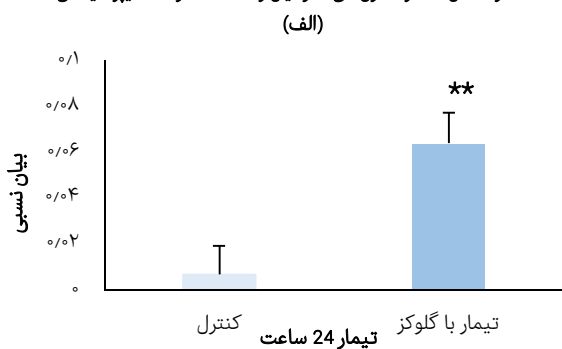
جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)	دمای ذوب (°C)
CALCRL F	5' GTGCTGATTCCATGGCGA CTTG 3'	۲۰۰	۶۰
CALCRL R	5' AGTGTTCCTACTAGGACA GTCATG 3'	۲۰۰	۶۰
GPR182 F	5' TGAGCTTTCAGGCACAC CA 3'	۱۸۰	۵۸
GPR182 R	5' CCACGAGTGCTTTTGACC CT 3'	۱۸۰	۵۸

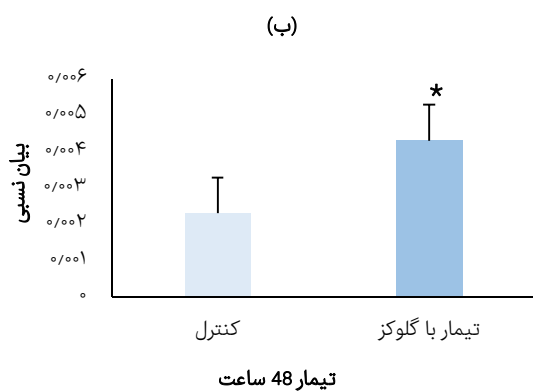
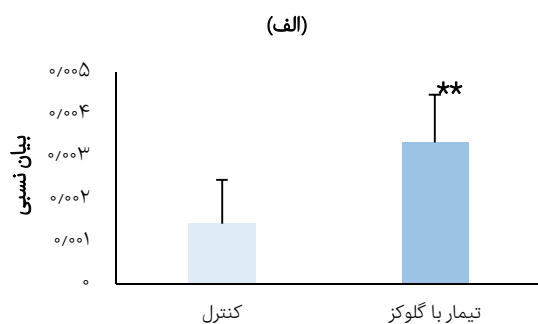
یافته‌ها

بررسی اثر گلوکز بر رشد سلول HUVEC

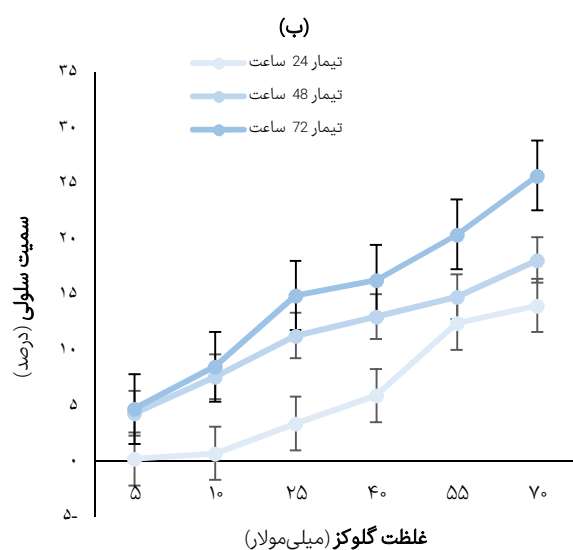
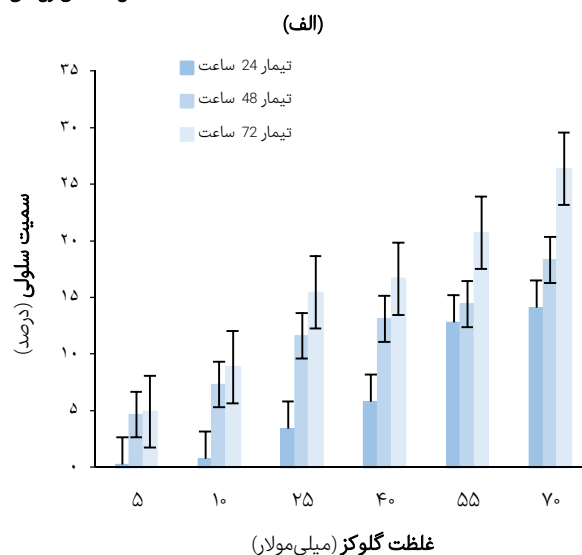
نتایج تیمار گلوکز بر سلول‌های HUVEC، یک روند مهار رشد سلول‌های اندوتلیال وابسته به غلظت و زمان را نشان داد. به گونه‌ای که در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ مهار رشد نسبت به زمان ۲۴ بیشتر بود که نشان‌دهنده کاهش توانایی زیستی سلول‌ها وابسته به زمان است. در غلظت بیش از ۴۰ میلی‌مولار مهار رشد سلول‌ها افزایش نشان داد. همچنین، غلظت ۲۵ میلی‌مولار نسبت به غلظت‌های ۴۰ و ۷۰ میلی‌مولار کمترین اثر را بر رشد و بقای سلول‌ها اعمال کرد. در این غلظت روند رشد سلول‌ها نسبت به



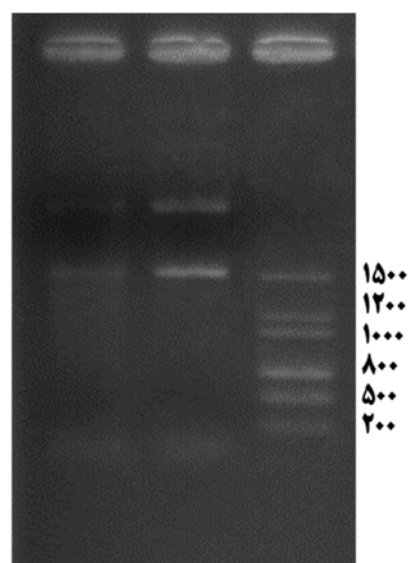
نمودار ۳) تغییر بیان ژن *CALCRL* در تیمار با گلوکز ۲۵ میلی‌مولار؛ (الف) تغییر بیان ژن *CALCRL* در تیمار ۲۴ ساعته با گلوکز؛ (ب) تغییر بیان ژن *CALCRL* در تیمار ۴۸ ساعته با گلوکز؛ * و ** به ترتیب نشان‌دهنده $p < 0.05$ و $p < 0.01$ هستند.



نمودار ۴) تغییر بیان ژن *GPR182* در تیمار با گلوکز ۲۵ میلی‌مولار؛ (الف) تغییر بیان ژن *GPR182* در تیمار ۲۴ ساعته و (ب) تیمار ۴۸ ساعته با گلوکز؛ ** نشان‌دهنده $p < 0.01$ است.



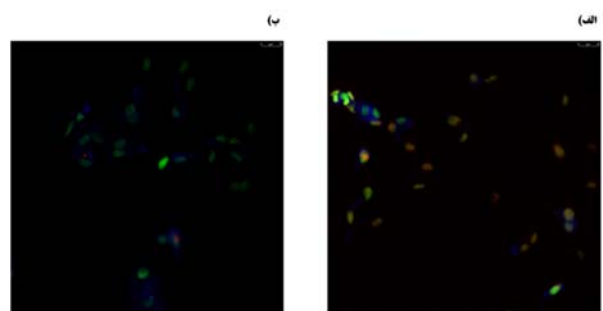
نمودار ۲) بررسی اثر تیمار گلوکز بر سمیت سلول HUVEC: (الف) ترسیم ستونی؛ (ب) ترسیم خطی



شکل ۱) نمونه‌ای از RNA استخراج‌شده از سلول HUVEC

تأثیر گلوکز بر مورفولوژی سلول

به منظور بررسی اثر تیمار گلوکز بر شکل ظاهری سلول‌های HUVEC از تست ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. در این مطالعه برای بررسی مورفولوژی سلول سه سیگنال رنگ وجود داشت. سیگنال سبز (سیتوکس گرین) نشان‌دهنده هسته سلول‌های زنده بود که از مقایسه سیگنال‌های سبزرنگ با استفاده از نرم‌افزار Image J 1.51 بین سلول‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با گلوکز) و تیمار شده با گلوکز (۲۵ میلی‌مولار) مشخص شد که هسته سلول‌هایی که تیمار شده‌اند نسبت به سلول‌های کنترل کوچکتر و چروکیده‌تر شده بودند. سیگنال آبی (phalloidin) نشان‌دهنده اسکلت سلولی اکتین بود که بررسی این سیگنال‌ها در سلول‌های تیمار شده نشان داد که بازآرایی اسکلت سلولی اکتین اتفاق افتاده است و سلول‌ها به هم نزدیک‌تر شده، کنار یکدیگر تجمع یافته و حالت توده‌ای ایجاد کرده‌اند. سیگنال نارنجی (ki67) نشان‌دهنده سلول‌هایی بود که تکثیر فعال دارند. با استفاده از نرم‌افزار Image J سیگنال‌های ki67 در دو حالت کنترل و تیمار بررسی و مشاهده شد که تعداد سلول‌های فعال در تیمار با گلوکز از ۸۵٪ در سلول‌های کنترل به ۳۰٪ کاهش یافته بود (شکل ۲).



شکل ۲) بررسی اثر تیمار با گلوکز بر مورفولوژی سلول HUVEC؛ الف) سلول‌های کنترل که با گلوکز تیمار نشده‌اند؛ ب) سلول‌هایی که گلوکز ۲۵ میلی‌مولار را به مدت ۲۴ ساعت دریافت کرده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

هایپرگلیسمی مشخصه و مهم‌ترین عامل خطر برای اختلال عملکرد اندوتلیال و عوارض عروقی است. در شرایط طبیعی فیزیولوژیکی، سطح گلوکز خون به منظور حفظ یکپارچگی عروقی به دقت تنظیم می‌شود^[14]، اما در شرایط هایپرگلیسمی که سطح گلوکز خون بالاتر از غلظت فیزیولوژیک است مانند دیابت نوع ۲، عملکرد سلول‌های اندوتلیال مختل می‌شود^[15].

عوارض عروقی ناشی از هایپرگلیسمی به یکی از چالش‌برانگیزترین اختلالات تبدیل شده است که باعث افزایش خطر ابتلا به بیماری‌ها و ایجاد عوارض مختلف برای بیماران می‌شود. به طور معمول، اثرات مخرب هایپرگلیسمی به دو بخش عوارض عروق ماکرو و میکرو تقسیم می‌شوند. عوارض عروق میکرو شامل رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی است، در حالی که عوارض عروق ماکرو شامل سکته مغزی، بیماری عروق کرونر و بیماری شریانی محیطی است^[16].

در حال حاضر نشانگرهای زیستی (بیومارکرها)، داروها و روش‌های درمانی موجود در مورد عوارض عروقی ناشی از هایپرگلیسمی در دسترس هستند، اما در تشخیص و درمان بیماری موثر نیستند و این نشان می‌دهد که هنوز درک از مکانیزم‌های مولکولی این اختلال متابولیکی ناقص است^[17].

هایپرگلیسمی باعث تداخل بین مسیرهای پیام‌رسانی مختلف و پروتئین‌های تنظیمی در اندوتلیوم می‌شود که در اختلال عملکرد اندوتلیال و در نتیجه عوارض عروقی نقشی تعیین‌کننده دارد. اختلال عملکرد اندوتلیال در دهه ۱۹۹۰ و اوایل دهه ۲۰۰۰ برای درمان نارسایی قلبی مورد توجه بود. امروزه نیز این اختلال به عنوان یک مشخصه در بیماری‌های متابولیک محسوب می‌شود^[18].

گیرنده‌های سلول‌های اندوتلیال در عملکرد این سلول‌ها نقش بسیار مهمی دارند. این گیرنده‌ها در چسبندگی سلول‌ها به هم نقش مهمی ایفا می‌کنند و به عنوان سنسور یا حسگر به مولکول‌های مختلفی از جمله لیپید، انتقال‌دهنده‌های عصبی، هورمون و گلوکز پاسخ می‌دهند. از بین گیرنده‌های سطح سلول‌های اندوتلیال GPCRها به دلیل فراوانی و نقش‌های مهمی که ایفا می‌کنند از اهمیت بالایی برخوردار هستند^[19, 20].

در مطالعه حاضر نشان داده شد که بیان دو GPCR منتخب GPR182 و CALCR1 در تیمار با گلوکز ۲۵ میلی‌مولار در دو بازه ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به حالت کنترل افزایش یافت. به دلیل اینکه این دو GPCR گیرنده‌های غشایی هستند و در سطح سلول‌های اندوتلیال حضور دارند در ارتباط مستقیم با تغییراتی هستند که در خون رخ می‌دهد. از جمله این تغییرات افزایش میزان گلوکز (۲۵ میلی‌مولار) در خون در شرایط هایپرگلیسمی است. افزایش میزان گلوکز در شرایط هایپرگلیسمی همیشه ۲۵ میلی‌مولار نیست و در بیماران در غلظت‌های بالاتر از این مقدار گزارش شده است. در این مطالعه از آنجایی که محدوده نزدیک به غلظت ۲۵ میلی‌مولار کمترین اثر سمیت آبی را داشت و اثر طولانی مدت گلوکز نیز اغلب ناشی از این غلظت است، از آن برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد^[21]. در این مطالعه افزایش بیان مشاهده شده می‌تواند بیانگر پاسخ این گیرنده‌ها به هایپرگلیسمی باشد. افزایش بیان می‌تواند مسیرهای پیام‌رسانی پایین‌دستی که توسط این دو گیرنده فعال می‌شوند را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین این مسیرها می‌توانند بر عملکرد سلول‌های اندوتلیال را تأثیر بگذارند و در ایجاد اختلال عملکرد اندوتلیال نقش داشته باشند.

مطالعات نشان داده‌اند که زمانی که سلول‌های اندوتلیال در معرض غلظت بالای گلوکز قرار می‌گیرند میزان تولید و ترشح نیتریک اکسید در آنها کاهش می‌یابد. به دنبال کاهش نیتریک اکسید میزان گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) درون سلول‌های اندوتلیال افزایش می‌یابد. ROS می‌تواند سبب فعال‌سازی کاسپاز ۳ شود که یکی از فاکتورهای شناخته شده در

- 3- Dackor RT, Fritz-Six K, Dunworth WP, Gibbons CL, Smithies O, Caron KM. Hydrops fetalis, cardiovascular defects, and embryonic lethality in mice lacking the calcitonin receptor-like receptor gene. *Mol Cell Biol*. 2006;26(7):2511-8.
- 4- Dai T, Natarajan R, Nast CC, LaPage J, Chuang P, Sim J, et al. Glucose and diabetes: Effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat shock protein 25, and actin cytoskeleton. *Kidney Int*. 2006;69(5):806-14.
- 5- Erukainure OL, Narainpersad N, Singh M, Olakunle S, Islam MS. Clerodendrum volubile inhibits key enzymes linked to type 2 diabetes but induces cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells via exacerbated oxidative stress and proinflammation. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1144-52.
- 6- Funk SD, Yurdagul A, Orr AW. Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: Lessons from type 1 diabetes. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:569654.
- 7- Habas K, Shang L. Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells. *Tissue Cell*. 2018;54:139-43.
- 8- Harrison D, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*. 2006;259(4):351-63.
- 9- Husted AS, Trauelsen M, Rudenko O, Hjorth SA, Schwartz TW. GPCR-mediated signaling of metabolites. *Cell Metab*. 2017;25(4):777-96.
- 10- Hamledari H, Sajjadi SF, Alikhah A, Boroumand MA, Behmanesh M. ASGR1 but not FOXM1 expression decreases in the peripheral blood mononuclear cells of diabetic atherosclerotic patients. *J Diabetes Complicat*. 2019;33(8):539-46.
- 11- Kim JY, Ku YS, Kim HJ, Trinh NT, Kim W, Jeong B, et al. Oral diabetes medication and risk of dementia in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;154:116-23.
- 12- Liu Ch, Wu J, Zou MH. Activation of AMP-activated protein kinase alleviates high-glucose-induced dysfunction of brain microvascular endothelial cell tight-junction dynamics. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(6):1213-21.
- 13- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm*. 2005;288(2):369-76.
- 14- Madonna R, Geng YJ, Shelat H, Ferdinandy P, De Caterina R. High glucose-induced hyperosmolarity impacts proliferation, cytoskeleton remodeling and migration of human induced pluripotent stem cells via aquaporin-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2014;1842(11):2266-75.
- 15- Matsumoto K, Fujishima K, Moriuchi A, Saishoji H, Ueki Y. Soluble adhesion molecule E-selectin predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2010;59(3):320-4.
- 16- Vitale C, Mercuro G, Cornoldi A, Fini M, Volterrani M, Rosano GM. Metformin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *J Intern Med*. 2005;258(3):250-6.
- 17- Nie Q, Zhu L, Zhang L, Leng B, Wang H. Astragaloside IV protects against hyperglycemia-induced vascular endothelial dysfunction by inhibiting oxidative stress and Calpain-1 activation. *Life Sci*. 2019;232:116662.
- 18- Pahwa R, Nallasamy P, Jialal I. Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial cell inflammation and perturbation of

روند مرگ آپاپتوتیک است. تمامی فرآیندهای ذکرشده منجر به کاهش زنده‌مانی و افزایش سمیت سلولی می‌شوند^[22, 23] که در این مطالعه نیز کاهش میزان زنده‌مانی سلول با استفاده از تست MTT و همچنین سنجش LDH نشان داده شد.

یکی دیگر از تاثیراتی که هایپرگلیسمی بر سلول‌های اندوتلیال می‌گذارد کاهش میزان اتصالات محکم است. اتصالات محکم با اسکلت سلولی اکتین در ارتباط هستند که مهم‌ترین آنها زونولا آکلودنس (ZO-1) و آکلودین است که در ارتباط مستقیم با اسکلت سلولی قرار دارند. کاهش میزان این اتصالات بر اسکلت سلولی تاثیر می‌گذارد و سبب بازآرایی آن می‌شود^[24-26]. همچنین مطالعه روی سلول‌های بنیادی پرتوان القاشده (iPS) نیز نشان داده است که القای هایپرگلیسمی موجب بازآرایی اسکلت سلولی اکتین و مهاجرت سلولی می‌شود^[27]. تغییرات موجود در اسکلت سلولی اکتین و مهاجرت سلولی در این مطالعه نیز می‌تواند ناشی از تاثیر هایپرگلیسمی بر اتصالات محکم سلول‌های اندوتلیال باشد.

در این مطالعه اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال از جوانب مختلفی مورد بررسی قرار گرفت و برای نخستین‌بار نقش احتمالی دو GPCR (*GPR182* و *CALCRL*) در این اختلال عملکرد ارزیابی شد. برای تایید نقش این دو گیرنده در اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال مطالعات بیشتری در سطح بالینی و مدل‌های حیوانی نیاز است. به‌طور کلی این مطالعه نشان داد که دو ژن *GPR182* و *CALCRL* می‌توانند در اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال دخیل باشند. این موضوع بیانگر اهمیت GPCRها در عملکرد سلول‌های اندوتلیال و استفاده از آنها به‌عنوان اهداف درمانی است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که هزینه‌های این پروژه را تامین کردند کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زینب رضائی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۵٪)؛ زهرا عابدی کیچی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۳۵٪)؛ مهرداد بهمنش (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰٪)

منابع مالی: حمایت مالی این مطالعه توسط دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- 1- Alharbi T, Thomacos N, McLelland G. Core competencies for diabetes educators: A scoping review. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2019;13(4):2671-82.
- 2- Reimann F, Gribble FM. G protein-coupled receptors as new therapeutic targets for type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2016;59(2):229-33.

- induced endothelial dysfunction via PI3K/eNOS pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;518(3):554-9.
- 24- Shukla K, Sonowal H, Saxena A, Ramana KV. Didymine prevents hyperglycemia-induced human umbilical endothelial cells dysfunction and death. *Biochem Pharmacol.* 2018;152:1-10.
- 25- Silambarasan M, Tan JR, Karolina DS, Armugam A, Kaur Ch, Jeyaseelan K. MicroRNAs in hyperglycemia induced endothelial cell dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):518.
- 26- Song K, Han HJ, Kim S, Kwon J. Thymosin beta 4 attenuates PrP (106-126)-induced human brain endothelial cells dysfunction. *Eur J Pharmacol.* 2020;869:172891.
- 27- Song KH, Bae SJ, Chang J, Park JH, Jo I, Cho KW, et al. Telmisartan mitigates hyperglycemia-induced vascular inflammation by increasing GSK3 β -Ser9 phosphorylation in endothelial cells and mouse aortas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;491(4):903-11.
- the endothelial glycocalyx. *J Diabetes Complicat.* 2016;30(4):563-72.
- 19- Pawlak JB, Wetzel-Strong SE, Dunn MK, Caron KM. Cardiovascular effects of exogenous adrenomedullin and CGRP in Ramp and Calcrl deficient mice. *Peptides.* 2017;88:1-7.
- 20- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22.
- 21- Hajime M, Okada Y, Mori H, Otsuka T, Kawaguchi M, Miyazaki M, et al. Twenty-four-hour variations in blood glucose level in Japanese type 2 diabetes patients based on continuous glucose monitoring. *J Diabetes Investig.* 2018;9(1):75-82.
- 22- Sebastiani G, Ceccarelli E, Castagna MG, Dotta F. G-protein-coupled receptors (GPCRs) in the treatment of diabetes: Current view and future perspectives. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(2):201-13.
- 23- Wang H, Yao Y, Liu J, Cao Y, Si Ch, Zheng R, et al. Dopamine D4 receptor protected against hyperglycemia-